

AZ EGRI BORVIDÉK BOTRYTIS CINEREA POPULÁCIÓINAK GENETIKAI JELLEMZÉSE

Sándor Erzsébet¹ – Váczy Kálmán² – Kövics György János¹ – Karaffa Levente³

¹Debreceni Egyetem, Agrártudományi Centrum, Mezőgazdaságtudományi Kar, Növényvédelmi Tanszék, 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.

²FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Eger, 3300 Eger, Kőlyuktető, Pf.: 83.

³Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, 4010 Debrecen, Egyetem tér 1.

Irodalmi áttekintés

A *Botrytis cinerea* (teleomorf: *Botryotinia fuckeliana*) egy haploid, heterotallikus, az Ascomycetes rendbe tartozó fonalas gomba. Nagy morfológiai és genetikai változékonysággal rendelkezik, amit hagyományosan a heterokariózis és az aneuploidia jelenségeinek tulajdonítottak. Újabb vizsgálatok szerint azonban a heterotallikus gomba két párosodási típusa mennyiségileg egyenlően oszlik meg, ez pedig egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a *B. fuckeliana* szexuális reprodukcióra is képes a természetben, és ez a heterokariózisnál és az aneuploidiánál sokkal jelentősebb tényezőként járulhat hozzá a faj genetikai változékonyságához (Beewer és Parkes, 1993). Nagyszámú (eddig bizonyítottan 235) mérsékeltövi gazdanövényt képes megtámadni, és rajtuk a szürkerothadás nevű betegséget kiváltani. A szőlőn megjelenő szürkepenész jelentős termés kiesést okozhat, emellett ronthatja a bor minőségét (Martinez és mtsai, 2003). A termelők különböző fungicidek alkalmazásával próbálnak védekezni a szürkerothadást okozó *B. cinerea* ellen, de egyre gyakrabban jelennek meg a különböző fungicidekkel szemben rezisztens törzsek (Alfonso és mtsai, 2000; Lattore és mtsai, 2002). A *B. cinerea* esetében a sikeres védekezést megnehezíti, hogy egyrészt nagyon variábilis gombáról van szó, másrészt a *B. cinerea* populációk struktúrájáról nincsenek megfelelő ismereteink.

A növénykórokozó gombák populációinak genetikai jellemzéséhez olyan markereket kell kiválasztani, amelyek (véltetően) függetlenek a szelekciós nyomás alatt álló tulajdonságoktól, és kellőképpen változékonyságúak a fajon belüli különbségek megjelenítéséhez.

A miniszatellit egy nem kódoló DNS szakasz, mely legtöbbször szétszórtan helyezkedik el a genomban. Rövid, 6-120 bázispárnyi (bp) szekvenciák, melyek tandem módon ismétlődnek. Teljes hosszuk 0,5-120 kilobázis (kb). Erősen variábilis régió, melyekben egyrészt a felépítő egységek

szekvenciája, másrészt az ismétlődő egységek száma változik (Jeffreys és mtsai, 1985). Giraud és mtsai 1998-ban találták meg a *B. cinerea* miniszatellit szekvenciáját (MSB1) az ATP szintetáz gén intronjában. Az általuk leírt miniszatellit 37 bp-nyi ismétlődő szakaszokból áll, AT gazdag, és csak egy lókuszon található a genomban. Az ilyen, egyetlen lókuszon megtalálható, igen variábilis miniszatellitek nagyon jól használhatóak a populációs paraméterek meghatározásához (McDonald és McDermot, 1993). A transzlációs elongációs faktor 2, ötödik és hatodik exonja közötti részt tartalmazó fragmentum (*tef 1*) szekvenciájának változékonyságát sikerrel használták egymáshoz közel álló *Trichoderma* csoportok vizsgálatára (Kulling-Gradinger és mtsai, 2002).

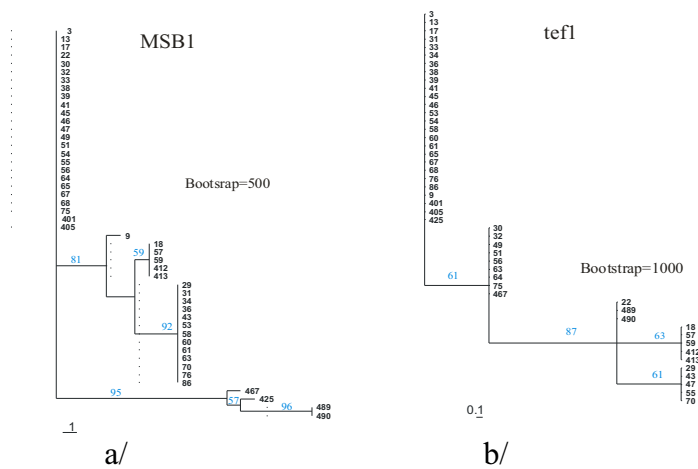
A transzpozon elemek mind az eukarióta, mind a prokarióta szervezetekben általánosan előforduló szekvenciák, és olyan spontán genetikai változásokat okoznak, amelyek hatására különféle biológiai változások alakulnak ki; továbbá szerepük van az érintett élőlény evolúciós változásaiban is (Smith és Corces 1991; McDonald és McDermot, 1993). A transzpozon elemeknek két fő csoportját különítik el (Finnegan 1988). Az első osztályba olyan retroelemek tartoznak, amelyek RNS közbeiktatásával, reverz transzkripció útján változtatják a helyüket; a második osztályba tartozóak pedig olyan DNS elemek, amelyek direkt módon (csak DNS-ként előfordulva) változtatják helyüket a genomban. Retroelemeket számos gombában találtak már, a *B. cinerea*-ban is leírtak kettőt. A *boty* az első osztályba tartozó „gypsy-like” (Diolez és mtsai 1995), a *flipper* pedig a második csoportba tartozó transzpozon elem (Levis és mtsai 1997).

Anyag és módszer

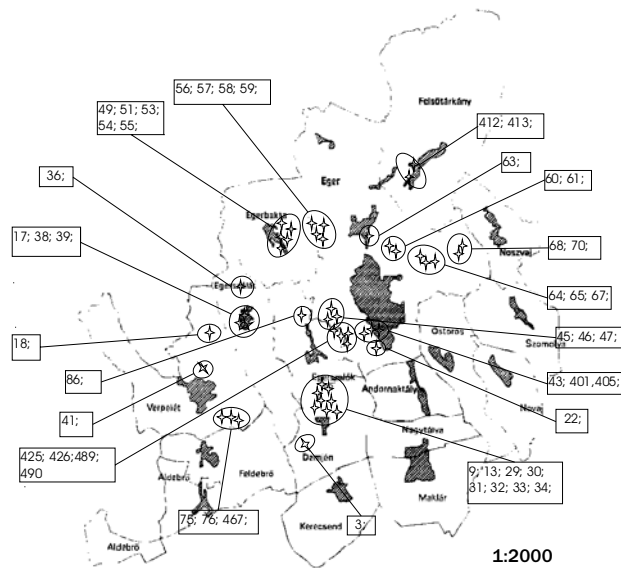
Az Egri Borvidék különböző területeiről tiszta, egyspórás *B. cinerea* izolátumokat gyűjtöttünk fertőzött bogyókról. Az izolátumokat burgonya-dextróz táptalajon (PDA, Scharlau) növesztettük. A DNS izolálás QuiaGene „Plant DNA Purification Kit”-tel történt. Az MSB1 és a *tef 1* felszaporítása Giraud és mtsai (1998), illetve [Wuczkowski](#) és mtsai (2003) leírása szerint történt. A szekvenálást az MWG Biotech (Erdberg, Németország) végezte. A transzpozonokat Munoz és mtsai (2002) leírása szerint mutattuk ki. A szekvenciák illesztését ClustalX programmal végeztük, míg az elemzésekhez és számításokhoz PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) filogenetikai programcsomagot használtunk. A számításokat bootstrap analízissel teszteltük.

Eredmények

Az MSB1 miniszatellit vizsgálata alapján Egri borvidék területén több populáció különíthető el (1.a/ ábra), melyek szétszórtnan helyezkednek el a borvidéken (2. ábra).



3. ábra: A *Botrytis cinerea* izolátumok a/ MSB1 és a b/ *tefI* szekvenciái alapján rajzolt „parsimony” gyökér nélküli fák. A vonalak feletti szám a bootstrap analízis eredményét jelzi.



4. ábra: A *Botrytis cinerea* izolátumok eredete

A *tefl* szekvencia analízise alapján szintén több *B. cinerea* csoport különíthető el a területen (1.b/ ábra). Ezek a csoportok kevés egyezést mutatnak az MSB1 szekvenciák alapján kialakított csoportokkal.

Chilei és francia *B. cinerea* populációk vizsgálatakor három csoportot különítettek el az egyes transzpozon elemek előfordulása szerint: 1) mindkét transzpozon elemet tartalmazó *transposa* izolátumokat, a csak Boty elemet tartalmazó *boty*-nak nevezett izolátumokat, illetve egyik elemet sem tartalmazó *vacuma* izolátumokat (Giraud és mtsai 1999; Munoz és mtsai 2002). Az Egri borvidéken a csak *flipper* transzpozont tartalmazó izolátumok fordultak elő legnagyobb számban (60%). Ez a genotípus nem volt megtalálható sem a francia, sem a chilei izolátumokban (Munoz 2002). A *transposa* csoport tagjai az izolátumok 32%, a *vacuma* minták pedig 8%-át tették ki.

Az Egri borvidékről begyűjtött *B. cinerea* izolátumok reprezentatív vizsgálata alapján a gomba nagy változékonyságot mutat, többféle genotípusa van jelen a borvidéken. Jövőbeni vizsgálataink célja, hogy meghatározzuk az Egri borvidéken szürkerothadást okozó *B. fuckeliana* populáció(k) legfőbb paramétereit: a populáció nagyságát és struktúráját, a szaporodás módját, a génáramlás sebességét. A növénypatogén gombapopulációk legfőbb jellemzőinek megismerése ugyanis elengedhetetlen a hatékony és gazdaságos védekezés kialakításához (McDonald és McDermott, 1993). Magyarország egyetlen borvidékén sem végeztek eddig hasonló vizsgálatokat, így hazai vonatkozásban hiánypótló munkára vállalkozunk.

Összefoglalás

A *Botrytis cinerea* (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*) világszerte előforduló gomba, mely szürkerothadást vált ki a megtámadott növényeken. A *B. cinerea* nagyon változatos megjelenésű, és genotípusában is nagy változékonyságot mutat. A legtöbb ellene használt fungiciddal szemben találtak már rezisztens változatokat.

A modern növénykórtan kiemelt figyelmet fordít a patogén gombapopulációk genetikai szerkezetének megismerésére, hogy ennek megfelelően alakíthassák ki a védekezés stratégiáját. Célunk, hogy feltárjuk az Egri borvidéken előforduló *B. cinerea* populációk genetikai diverzitását. Ennek keretében megvizsgáltuk, hogy a Franciaországban és Chilében korábban leírt *transposa*, *vacuma* és *boty* csoportok közül melyek találhatók meg az általunk vizsgált területen. A *transposa*, *vacuma* és az egyedül *flipper* transzpozon elemeket hordozó (*flipper* csoportba tartozó) izolátumokat mutattunk ki az Egri borvidéken. Ezen kívül az MSB1 miniszatellit és a *tefl* (transzlációs elongációs faktor 1) szekvencia

elemzését végeztük el. Eredményeink alapján a gomba nagy genetikai változékonyságot mutat a területen, és alig találhatóak klonális csoportok.

Karaffa Erzsébet (szül.: Sándor Erzsébet) az MTA Bólyai János Kutatói Ösztöndíjasa. Kutatásainkat az FVM 33013/2003 és az FVM 62004 pályázataiból fedeztük.

Irodalom

- Alfonso, C., Raposo, R., and Melgareji, P. (2000): Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology* 49:243-251.
- Beewer, Parkes, (1993): Mating Behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zeland. *New Zeland J Crop Horticultur Sci* 21: 303-310.
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D., Brygoo, Y. (1995): Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Enviromental Microbiol.* 61:103-108.
- Faretra, F., Pollastro, S. (1991): Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycol. Res.* 95:943-951.
- Finnegan, D.J. (1988): Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* 5: 103-107.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., and Brygoo, Y. (1998): The minisatellite MSB1, in the fungus *Botrytis cinerea*, probably mutates by slippage. *Mol. Biol. Evol.* 15 (11):1524-1531.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBouglio, K., and Brygoo, Y. (1999): Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma* are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89:967-973.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., and Thein, S.L. (1985): Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316:76-79.
- Kulling-Gradinger, C.M., Szakács, G., and [Kubicek, C.P.](#) (2002): Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Microbiol Res.* 158:125-133.
- Latorre, B.A., Spadaro, I., and Rioja, M.E. (2002): Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* 21:957-961.
- Levis, C., Fortini, D., and Brygoo, Y. (1997): *Flipper*, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol. Gen. Genet.* 254:674-680.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., and Fernaud, M. (2003): Phenotypic differences between *vacuma* and *transposa*

subpopulations of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 109:479-488.

McDonald, B.A. and McDermott, J.M. (1993): Population genetics of plant pathogenic fungi. BioScience 43:311-319.

Munoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., and Giraud, T. (2002): Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. Mycol. Research 106:594-601.

Smith, P.A and Corces, V.G. (1991): *Drosophila* transposable elements: mechanisms of mutagenesis and interactions with the host genome. Adv. Genet. 29:229-300.

[Wuczkowski, M.](#), [Druzhinina, I.](#), [Gherbawy, Y.](#), [Klug, B.](#), [Prillinger, H.](#), and [Kubicek, C.P.](#) (2003): Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. Microbiol. Res. 158:125-133.

GENETIC CHARACTERIZATION OF *BOTRYTIS CINEREA* POPULATIONS FROM THE EGER WINE REGION, HUNGARY

E. Sándor¹, K. Váczy², G.J. Kövics¹ and L. Karaffa³,

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

²Research Institute of Viticulture and Enology, Eger, Hungary

³Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Botrytis cinerea (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*) is a phytopathogenic fungus that causes grey mould on a wide range of plants in temperate regions worldwide. *B. cinerea* has been shown to have several variable genetical and physiological traits, and it has developed resistance against most of the fungicides used to control it.

The modern phytopathology is increasingly taking into account the genetic structure of pathogen populations in order to gain insight into control strategies. Our aim was to evaluate the genetic diversity of *B. cinerea* in the Eger wine region of Hungary. We wanted to determine, whether the three genetically different groups *transposa*, *vacuma* and *boty*, had been earlier described in France and Chile, were present in this region. *Transposa*, *vacuma* isolates were found and, in addition, isolates containing *Flipper* alone (*flipper* isolates) were also detected. Moreover sequence analysis of MSB1 minisatellite and *tefl* (translation elongation factor 1) revealed a high degree of genetic diversity, with no widespread clonal lineages.

This work was supported by the Hungarian Ministry of Agriculture and Rural Development, FVM 33013/2003 and 2003 and 46024/2004 grants. Erzsébet Sándor is a grantee of the János Bolyai Scholarship.